Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. E. Helmreich

UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT LÖSLICHER UND IMMOBILISIERTER ENZYME AM BEISPIEL TRYPSIN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Hanns-Jochen Bade

aus Hof/Saale

Würzburg, den 7. August 1979

1980

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. E. Helmreich

UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT LÖSLICHER UND IMMOBILISIERTER ENZYME AM BEISPIEL TRYPSIN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Hanns-Jochen Bade

aus Hof/Saale

Würzburg, den 7. August 1979

Referent: Professor Dr. Dieter Palm

Korreferent: Professor Dr. Ernst Helmreich

Dekan: Professor Dr. Otto Schrappe

Tag der mündlichen Prüfung: 18.2.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	ALLGEMEINER TEIL	1 - 1(
1.	Charakterisierung der Immobilisation	1
2.	Eigenschaften des Trypsins	5
3.	Stabilitätsverhalten des nativen Trypsins bei verschiedenen Bedingungen	7
3.1	Aktivitätsverhalten gegenüber pH-Veränderungen	7
3.2	Aktivitätsverhalten bei verschiedenen Temperaturen	8
3.3	Aktivitätsverhalten gegenüber Ionen	9
4.	Stabilitätsverhalten des immobilisierten Trypsins bei verschiedenen Bedingungen	10
4.1	Aktivitätsverhalten bei verschiedenen pH-Werten	11
4.2	Aktivitätsverhalten bei verschiedenen Temperaturen	12
4.3	Aktivitätsverhalten in Gegenwart von Substrat	12
5.	Probelematik des Begriffs "Stabilität"	14

II. EXPERIMENTELLER TEIL 16 - 40

1. Material 16

2. Methoden 17

2.1 Titrimetrisch 17

2.1.1 Puffer 17

2.1.1 Substrat 17

2.1.3 Lösliches Enzym 18

2.1.4 CM-Trypsin 18

2.1.5 MAL-Trypsin 18

2.2 Photometrisch 19

3. Natives Trypsin 20

3.1 Aktivitätsabnahme in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur 20

3.1.1 Berechnung der Aktivität 21

3.1.2 Berechnung von A_o 22

3.1.3 Auswertung der Meßergebnisse 22

3.2 Aktivitätsabnahme in Abhängigkeit vom pH 29

4. Immobilisiertes Trypsin 32

4.1 Aktivitätsabnahme in Abhängigkeit von Zeit, pH und Temperatur 32

4.2 Aktivitätsabnahme in Gegenwart von Substrat 38

4.2.1 Abhängigkeit des Umsatzes von der Durchflußgeschwindigkeit 38

4.2.2 Aktivitätsabnahme in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur 39

III. DISKUSSION 41 - 44

1. Stabilität des nativen Trypsins in Lösung 41

2. Stabilität des immobilisierten Trypsins 42

3. Betriebsstabilität des immobilisierten Trypsins 44

IV. EMPFEHLUNGEN FÜR DIE STANDARDISIERUNG VON STABILITÄTSANGABEN 45 - 47

1. Definition eines Standard-Assays 45

2. Testbedingungen für die Lagerstabilität 46

3. Testbedingungen für die Betriebsstabilität 47

I. ALLGEMEINER TEIL

1. Charakterisierung der Immobilisation

Nur wenige Enzyme existieren als freie Proteinmoleküle in wäßriger Lösung. Die meisten werden entweder membrangebunden, in partikulären Einheiten, z.B. wie in den Mitochondrien oder aber in sonstigen festen Zuordnungen (Kompartmentierung) gefunden (1). Früher betrachtete man das Verhalten der Enzyme unabhängig von ihrer natürlichen Umgebung. Seit ca. 1965 benutzt man vor allem für membrangebundene Enzyme Modellsysteme, in denen Enzyme verwendet werden, die durch eine Bindung an Träger, wie CM- Cellulose, polymerisiertes Maleinsäureanhydrid oder Membranen, immobilisiert wurden.

Man kennt 4 Hauptgruppen der Immobilisation (2):

1) durch physikalische oder chemische Adsorption,
2) durch kovalente Bindung an lösliche oder unlösliche Polymere,
3) durch Verbinden der Proteinmoleküle,
4) durch Einbetten in Gele oder Membranen oder durch Mikroverkapsulierung.

Die Trägervariationen, die aus diesen vier Gruppen resultieren, sind sehr groß. Die chemische Natur der Träger und der mit ihnen verbundenen Proteine ergibt zusätzlich eine große Zahl verschiedener Möglichkeiten zur kovalenten Verknüpfung. Als Beispiele seien die Bromcyanaktivierung von Hydroxylgruppen eines Polysaccharids und anschließende Bildung von Carbaminaten mit Aminogruppen (3) und die Oberflächenbeschichtung von

porösem Glas mit Alkyloamino-silanen (4) genannt. Andere weitverbreitete Möglichkeiten sind die physikalische Adsorption (5, 6, 7) und die Verwendung intakter Zellen von Mikroorganismen (6).

Die Auswirkungen der Immobilisation auf das Enzym sind vom Enzym selbst und von der gewählten Immobilisierungsmethode abhängig. Allgemein kann man sagen, daß bei Präparationen immobilisierter Enzyme V_{max} sinkt, bei einem gleichzeitigen Anstieg von K_m - verglichen mit dem freien Enzym - was gewöhnlich auf die erschwerte Substratdiffusion zurückzuführen ist (8).

Die Vorteile der Immobilisierung sind leicht einzusehen:

1) Die Enzyme können wiederverwendet werden;
2) die Trennung von Enzym und Produkt ist einfacher;
3) man kann die Enzyme in Durchflußreaktoren verwenden;
4) eine bessere Kontrolle der Reaktion ist möglich;
5) eine Steigerung der Stabilität ist für einige Enzyme, z.B. Trypsin, beschrieben worden (7, 8).

Deshalb haben sich die immobilisierten Enzyme auf folgenden Gebieten praktisch bewährt:

1) In der Analytik:

Bemerkenswert sind die Entwicklung von Enzymelektroden (9, 10), Enzym- Thermistoren (11) und die Verwendung von Enzymen in automatisierten Analysatoren, bei denen sie kovalent an Nylon gebunden sind (12).

2) In der Organchemie:

Als Beispiel sei hier die Arbeit an der Biotransformation von

Arzneimittel gewählt, wo gewöhnlich nur ganz geringe Mengen der spezifischen Metaboliten gewonnen werden können, primär als Referenz zur Identifizierung dieses Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten.

3) In der Medizin:

Das Anwendungsgebiet in der Medizin ist sehr weit gefächert. Es reicht von der Tumortherapie (a) über die Anwendung bei genetischen Defekten (b) bis hin zur Erniedrigung des Serumharnstoffes (c) (13).

a) Zur Anwendung kommt L-Asparaginase als Modell einer Enzymtherapie für substratabhängige Tumoren. Studien haben gezeigt, daß man mit L-Asparaginase in ca. 60% der Fälle der akuten lymphatischen Leukämie eine komplette Remission erzielen kann. Die Vorteile dieser Behandlung sind der hohe therapeutische Index und das Fehlen von Kreuzresistenzen mit anderen Cytostatica; die Nachteile sind die schweren Nebenwirkungen und die Resistenzentwicklung des Tumors.

b) Eine andere Möglichkeit trägergebundene Enzyme therapeutisch anzuwenden, ist das Bestreben, genetisch bedingte Enzymdefekte zu substituieren. Die bisherigen Versuche mit löslichen Enzymen waren nicht erfolgreich, weil wasserlösliche Präparationen relativ schnell inaktiviert werden. Immobilisierte Enzyme können aber nicht nur an wasserunlösliche Träger gebunden werden, sondern sie können auch mikroverkapselt oder an Membranen fixiert werden. Als Applikationsarten kann man wählen: lokale Implantation durch Injektionen, extrakorporale Shuntsysteme, lokale Applikation oder Lokalisation im Intestinaltrakt.

c) Auch Folgen chronischer Leiden, wie die Urämie bei Nieren-

insuffizienz, versucht man mit oral verabreichter Urease zu beherrschen. Versuche mit beidseits nephrektomierten Hunden ergaben einen verringerten Harnstoffspiegel in Blut.

4) In der Technik:

Durch ihre Vorteile sind immobilisierte Enzyme auch in der großtechnischen Anwendung verstärkt im Einsatz. So ließen sich die Kosten bei der Herstellung von L-DOPA unter Verwendung von immobilisierter Aminoacyclase bei einer Tagesproduktion von ca. 700 kg auf etwa 60% senken (1). Zur Herstellung halbsynthetischer Penicilline wird immobilisierte Penicillin-Amidase verwendet. Das hervorstechenste Beispiel einer großtechnischen Anwendung läßt sich in der Nahrungsmittelindustrie der USA aufzeigen. Dort wird Sirup mit einer hohen Fructosekonzentration hergestellt, indem man 93%-ige Glucoselösung mit Hilfe von immobilisierter Glucose-Isomerase in 42%-ige Fructose überführt. Die Produktionsmenge beträgt 500 Millionen lb. pro Jahr.

Vor einer Anwendung für biotechnische Prozesse ist eine standardisierte Beschreibung der Eigenschaften eines immobilisierten Enzyms und ein Vergleich mit dem nativen Enzym erforderlich. Hierfür wurden von einem Arbeitsausschuß der DECHEMA (Deutsche Gesellschaft für chemisches Apparatewesen) Vorschläge erstellt. Die vorliegende Arbeit ist als ein Beitrag zur Aufstellung von Regeln für die Überprüfung der Stabilität immobilisierter Enzyme vorgesehen.

Der Arbeitsausschuß sieht die Untersuchung folgender Enzymsysteme vor:

1) Enzyme ohne Effektoren, die ein Substrat umsetzen (Beispiel: Trypsin);
2) Enzyme, die ein Substrat in Gegenwart eines Kofaktors umsetzen (Beispiel: Alkoholdehydrogenase aus Hefe);
3) Enzyme, die Makromoleküle umsetzen (Beispiel: Amylase);
4) Enzymreaktionen, die unter Beteiligung von physikalisch gelösten Gasen ablaufen (Beispiel: Glucose-Oxidase)

Die Arbeit soll insbesondere ein Beitrag zur Untersuchung der ersten Gruppe dieser Aufstellung sein.

2. Eigenschaften des Trypsins

Die "Gruppe der Trypsine" der verschiedenen Spezies wie Mensch, Schwein, Schaf, Truthahn, Haifisch, Flußkrebs, weiße Garnelen usw., besitzt ein Molekulargewicht von 20,000 bis 25,000 (14). Sie katalysiert bevorzugt die Esterhydrolyse (15) und die Peptidspaltung von Verbindungen, die durch die Carboxylgruppen der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin gebildet werden. Im aktiven Zentrum stehen ein Serin und ein Histidin.

Im Pankreas wird das Zymogen Trypsinogen (I) synthetisiert (Abb. 1). Durch den Nahrungsreiz kommt es zu dessen Ausschüttung ins Duodenum, wo sich die Aktivierung entweder durch vorhandenes Trypsin, Enterokinase oder Thrombin vollzieht. Dabei wird ein Hexapeptid abgespalten. Der größte Anteil besteht dann aus β-Trypsin (II), während α-(III) und Pseudotrypsin (ψ-Trypsin) (IV) nur in geringen Maße entstehen (Abb. 1)

Das Molekulargewicht der verschiedenen Formen ist gleich.

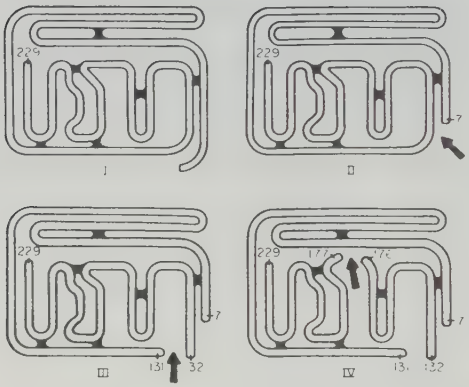
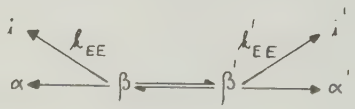


Abb. 1

Es ist aber möglich, daß die Einfachkettenform β-Trypsin durch geeignete Manipulationen, z.B. durch Temperaturerhöhung, in die Zweikettenform α-Trypsin übergeht und dadurch an katalytischer Aktivität verliert. Zum anderen scheint es auch je zwei verschiedene α- bzw. β-Trypsine zu geben, die, wie im Schema dargestellt, ineinander überführbar sind (16):



Etwas ähnliches könnte man sich für einen Übergang ins ψ-Trypsin vorstellen, das dann nur noch ein geringes katalyti-

sches Spektrum besitzt (17).

Die isoelektrischen Punkte der Zymogene von Rind und Schwein sind unterschiedlich, 9.3 bzw. 7.5. Auffallend ist, daß die Trypsine beider Spezies den gleichen IEP, 10.8, besitzen. Das pH-Optimum liegt bei 7.8, das "Temperaturoptimum" bei 40° C (Substrat Casein) (18).

3. Stabilitätsverhalten des nativen Trypsins bei verschiedenen Bedingungen

3.1. Aktivitätsverhalten gegenüber pH-Veränderungen

Das Stabilitätsmaximum liegt bei pH = 2.3 (19). Im Bereich von $pH \leq 2$ und $pH > 13$ ist die Reaktion monomolekular, d.h. der Aktivitätsabfall rührt von der Proteindenaturierung her und folgt der I. Reaktionsordnung:

$$-\frac{dA}{dt} = k_1 A$$

Zwischen pH = 2 und pH = 10 (30° C) erfolgt die Denaturierung durch Autolyse, die der II. Reaktionsordnung folgt (15):

$$-\frac{dA}{dt} = k_2 A^2$$

Daraus ist zu folgern, daß am katalytischen pH-Optimum ein Minimum an Stabilität anzutreffen ist. Bei geeigneten Bedingungen (15 min. Inkubation bei 0° C) läßt sich ein zweites Stabilitätsmaximum bei pH = 13 nachweisen, wobei sich die Aktivität bis ca. 60% der Ausgangsaktivität erholt. Bei $10 \leq pH \leq 12$ (30° C) ist eine Übergangszone, in der die Reaktion mono- und bimolekular abläuft:

$$-\frac{dA}{dt} = k_1 A + k_2 A^2$$

Der pH-Wert, an dem nur noch der monomolekulare Aktivitätsverlust auftritt, ist von der Temperatur abhängig. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 30° C (1.36×10^{-7} M Trypsin in 0.01 M $CaCl_2$) erhält man noch eine Restaktivität von 99% bei pH = 5.0, 98% bei pH = 9.0, 90% bei pH = 10.0 und 51% bei pH = 10.7 (20).

Dies alles gilt für die irreversible Denaturierung. Daneben gibt es noch den Effekt der reversiblen Denaturierung (19) in alkalischer Lösung, die unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration ist. Auch die Temperatur bewirkt einen ähnlichen Effekt (21). Gibt man Trypsin, das bei pH = 13 gelöst wurde, sofort in salzfreie Säure mit pH = 2.0 und läßt es wenige Stunden stehen, so erreicht die Aktivität wieder fast den Ausgangswert.

3.2 Aktivitätsverhalten bei verschiedenen Temperaturen

Bei Erwärmung geht die Restaktivität nicht linear zurück, sondern es entstehen Sprünge, die Temperaturbereiche voneinander abgrenzen (16, 22). Gabel und Kasche interpretieren dies als Folge des "multistate unfolding". Es ergaben sich folgende Temperaturbereiche:
I: 20 - 40° C, II: 40 - 45° C, III: 45 - 55° C und IV: > 55°C.
Dabei war die Steigung III > I im Arrhenius - Plot. Diese verschiedenen Temperaturfelder erschweren die Aussagen über

das Stabilitätsverhalten.

Bei Temperaturen über 50° C hängt die spezifische Aktivität zusätzlich von der Art und Weise der Enzymzugabe ab (23). Gibt man das Enzym als erstes zu der thermostatisierten Salzlösung und dann ins Substrat, so ist die gemessene Aktivität geringer als wenn man die Reihenfolge umkehrt.

Die Transformation von β-Trypsin in α-Trypsin scheint die Hitzestabilität zu verringern.

3.3 Aktivitätsverhalten gegenüber Ionen

Kalziumionen steigern die Temperaturstabilität. Es ergab sich eine verminderte Autolyse bis zu einer Inkubationstemperatur von 65° C (23). Man postuliert einen Kalzium - Enzym - Komplex, der über und unter 40° C gebildet wird, ohne daß er chromatographisch nachzuweisen ist. Kalziumionen (25) steigern noch wie auch Alkohole (24) die Enzymaktivität. Dabei ergab sich eine pH- und Temperaturabhängigkeit der Kalziumaktivierung. Kalziumkonzentrationen unter 10^{-6} M sind wirkungslos. Eine Aktivierung tritt ein bei Konzentrationen zwischen 10^{-6} und 10^{-3} M. Eine weitere Konzentrationserhöhung bringt keine weitere Aktivitätssteigerung.

4. Stabilitätsverhalten des immobilisierten Trypsins bei verschiedenen Bedingungen

Aus dem Wissen um die Autolyse folgt, daß die Immobilisierung eine Methode der Stabilisierung von Proteasen durch physikalische Trennung ist. Der Nachteil der Immobilisierung ist die Verringerung des Substratumsatzes und damit eine Erhöhung von K_m durch Diffusionserschwernis bei hochmolekularen Substraten. So sinkt die Casein - Spaltung auf ca. 1/5 der BAEE (N^{α} - Benzoyl - L - Arginin - äthylester - hydrochlorid) Hydrolyse (8). Andere Messungen ergaben bei gleicher Aktivität gegenüber Ester und Proteinen ein Verhältnis von 22.5 :130 mg eingesetztes Enzym (26).

Die katalytischen Eigenschaften wie Temperaturoptimum, K_m usw. werden in hohem Maße vom Trägermaterial beeinflußt (27). So beträgt das "Temperaturoptimum" für Trypsin 40° C, für an CM-Cellulose gebundenes Trypsin 65° C und für an polymerisiertes Maleinsäureanhydrid gebundenes Trypsin 55° C (18).

Für das pH-Optimum spielt der Träger zwar eine Rolle (28), aber wichtiger ist der Aminosäurerest zwischen Enzym und Träger, der die Tertiärstruktur aufrecht erhält (29). Das pH-Optimum wird alkalischer, z.B. bei CM-Cellulose-Trypsin pH = 9.5. Für IMET (water-insoluble maleicacid-ethylene-Trypsin) gilt, daß sich bei niedrigen Ionenstärken das pH-Optimum um 3 pH-Einheiten ins alkalische verschiebt, im Vergleich zum nativen Enzym, bei hohen Ionenstärken geht das pH-Optimum ins saure (8). Bei $\Gamma/2$ = 1.0 haben das lösliche Trypsin und IMET-3 das gleiche pH-Optimum. Daraus ist zu

schließen, daß die Trägereigenschaften durch hohe Ionenstärken wieder ausgleichbar sind (28).

4.1 Aktivitätsverhalten bei verschiedenen pH-Werten

Die pH-Stabilität ist vom Verhältnis Träger - Enzym und von der Art des Trägers abhängig. Der Enzymanteil ist im IMET-6 größer als im IMET-1. IMET-1 zeigt im Stabilitätsmaximum eine höhere Restaktivität als IMET-6 (24h bei 25° C inkubiert), die außerhalb dieses Bereichs steil abfällt. IMET-6 dagegen hat einen flacheren Abfall. IPTT (water-insoluble polystyrol Trypsin) besitzt ebenfalls den flachen Abfall bei pH-Werten im sauren und alkalischen, hat aber zusätzlich ein Aktivitätsniveau, das zwischen IMET-1 und IMET-6 liegt (8).

Für IPTT wird je nach Beladung $t_{50\%}$ = 4.5 Monate bis $t_{65\%}$ = = 5.0 Monate angegeben (Lagerung bei 4° C in 0.0025 N HCl) (26).

Die pH-Zonen der reversiblen Denaturierung von trägergebundenen Enzymen sind von der Temperatur während der Inkubationszeit abhängig. Für die Irreversibilität der Denaturierung sind zwei Gründe maßgebend:

- Verlust der Regenerationsfähigkeit des Proteins
- starkes Ansteigen von sekundär irreversibler Denaturierung (21)

Acetyl-Trypsin ist durch Kalziumionen stabilisierbar.

4.2 Aktivitätsverhalten bei verschiedenen Temperaturen

Eine verbesserte "Temperaturstabilität" muß nicht gleichzeitig mit einer Erhöhung des Temperaturoptimums verbunden sein. So liegt das "Temperaturoptimum" von acetylierten Trypsin niedriger als das des nativen Enzyms, obwohl seine "Temperaturstabilität" geringer ist (21).

4.3 Aktivitätsverhalten in Gegenwart von Substrat

Um das Verhalten immobilisierter Enzyme unter Betriebsbedingungen zu testen, wurde eine Säule (ø 0.6 cm, h = 3 cm) mit IPTT-3 beschickt und mit einer konstanten Menge an L-Argininmethylester durchströmt (0.01 M Ester, pH = 6.1, Durchfluß 0.2 ml/min) (26). Erst nach einer Woche (2.0 g des Esters waren umgesetzt) zeigte sich ein Abfall der Aktivität. Die Menge an hydrolysiertem Substrat ist der Durchflußrate umgekehrt proportional. Bei gegebener Flußrate ist die hydrolysierte Substratmenge umgekehrt proportional der Anfangskonzentration S_o, d.h. die Produktkonzentration im Ausfluß ist von der Anfangskonzentration S_o unabhängig.

Die Michaelis - Menten - Gleichung für die Säule lautet:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{k(E_o)(S)}{K_m + (S)}$$

mit E_o = Enzymkonzentration

S = Substratkonzentration

S_h = Substratkonzentration im Ausfluß

h = Säulenhöhe

V = Flußrate (cm/sec)

Nach Integration und $S \gg K_m$ gilt:

$$\frac{(S_o) - (S_h)}{(S_o)} = \frac{k(E_o)h}{(S_o)V}$$

5. Problematik des Begriffs "Stabilität"

Die Bezeichnung "Stabilität" wird allgemein mit sehr verschiedenem Begriffsinhalt verwendet. Beispiele hierfür sind die auf den einführenden Seiten zitierten Untersuchungen über pH- und Temperaturstabilität. Daneben wird der Begriff "Stabilisierung" für Veränderungen der Eigenschaften eines Proteins, z.B. einer Protease gegenüber der Autodigestion verwendet. Diese "Stabilisierung" drückt strukturelle Eigenschaften eines Proteins aus und ist abhängig von der umgebenden Lösung, der Anzahl und Art der kovalenten Bindungen und dem Gelingen eines "Einfrierens" der aktiven Konformation durch intramolekulare Vernetzung. Demgegenüber soll "Stabilität" als zeitabhängige (kinetische) Größe betrachtet werden, die den Erhalt der Enzymaktivität gegenüber verschiedenen Einflüssen beschreibt. Aus praktischen Überlegungen ist es wünschenswert, den Begriff der "Stabilität" in "Lagerstabilität" und "Betriebsstabilität" zu unterteilen. ZARBORSKY (30) gibt eine klare Zusammenfassung der Faktoren wie pH, Temperatur, Stabilisatoren und denaturierende Stoffe, die beide Stabilitätsgruppen beeinflussen. Kommerziell hergestellte Enzyme kann man in kristalliner Form, Suspension oder Lösung mit und ohne Stabilisatoren und lyophylisiert erwerben, für welche die Hersteller keinen Aktivitätsverlust innerhalb eines halben Jahres oder länger garantieren. Es ist daher schwierig, die Vorzüge immobilisierter Enzyme in der Haltbarkeit aufzuzeigen.

Die Abnahme der Aktivität löslicher Enzyme folgt meist der I. Reaktionsordnung - mit Ausnahme der Proteasen wie Trypsin - während immobilisierte Enzyme oft mehrphasisch erscheinen.

Einer der Gründe könnte in der Heterogenität der Präparation zu suchen sein, durch die Mikroumgebung und die variable Anzahl und Lage der kovalenten Bindungen.

Pseudostabilität (31) wurde definiert als ein Zustand, bei dem trotz hohem Substratangebot ein Anteil der Enzymmoleküle (latente Enzymkonzentration) zu Beginn ohne Einfluß auf den Substratumsatz ist. Dies kann z.B. durch Diffusionserschwernis und Partikelgröße hervorgerufen werden. Im Laufe der Zeit werden alle Enzymmoleküle zur Katalyse herangezogen, sodaß die Aktivität nicht abfällt, vielleicht sogar ansteigt, obwohl der Denaturierungsprozess schon eingesetzt hat.

Die Stabilität wird am besten durch den Enzymaktivitätsverlust angegeben, somit stehen die analytischen Methoden zur Erfassung der Restaktivität im Vordergrund. Dabei gibt es grundsätzlich für Trypsin verschiedene Möglichkeiten, einmal mit sog. "active site titrants" (32, 33, 34), dann die Messung der Proteaseaktivität mit Substraten wie Casein (35, 36), Hämoglobin (36) sowie die Messung der Esteraseaktivität mit BAEE, BAME, usw. (24, 37).

Bei vergleichenden Messungen zur Aktivität mit immobilisierten Enzymen sollte man niedermolekulare Substanzen vorziehen, um möglichst geringe Verfälschungen der Vergleichbarkeit durch erschwerte Diffusion oder sterische Hinderung zu erhalten.

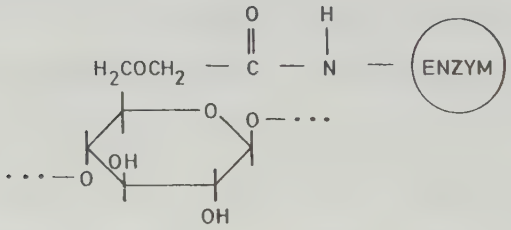
II. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Material

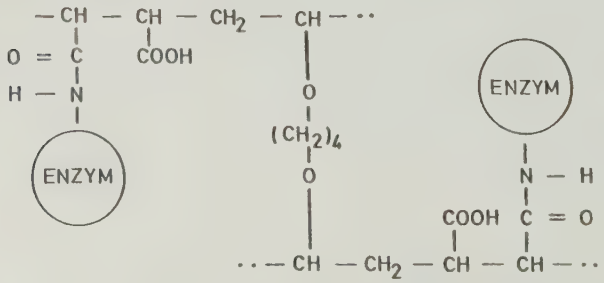
Als Enzyme wurden verwendet (Hersteller Fa. Merck, Darmstadt):

a) Ein Gemisch aus α/β-Trypsin vom Rind, EC 3.4.21.4, Art.-Nr. 24579;

b) Trypsin vom Rind, polymer an CM-Cellulose gebunden (CM-TRY), Art.-Nr. 24582 (38);



c) Trypsin vom Rind, polymer an vernetztes Maleinsäureanhydrid (MAL-TRY) gebunden, Art.-Nr. 24633 (38).



Es wurden immer die gleichen Chargen verwendet.

d) Für die titrimetrischen Messungen wurden N^{α}-Benzoyl-1-Argininäthylester-Hydrochlorid (BAEE), MG 342.83 verwendet (24, 37), für die optische Meßmethode N^{α}-Benzoyl-L-Arginin-p-Nitroanilidhydrochlorid (BAPA), MG 434.89 (39, 40). Die verwendeten verschiedenen Chargen hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Meßergebnisse. Bei BAEE betrug der Variationskoeffizient der 100%-Anfangsaktivitäten 4.6%, wobei kein Wert die 2α-Vertrauensgrenze erreichte.

2. Methoden

2.1 Titrimetrisch

Trypsin spaltet die Esterbindung des BAEE. Dabei werden saure Gruppen freigesetzt, die mit Natronlauge titriert werden können (37). Der Verbrauch an Lauge ist direkt proportional den freigesetzten Carboxylgruppen und damit auch der Enzymaktivität. Die Hydrolyse folgt der 0. Reaktionsordnung (15, 41).

2.1.1 Puffer

0.1 M KCl, 0.05 M $CaCl_2$, 0.01 M Tris-Puffer mit HCl auf pH = 7.75 gebracht.

2.1.2 Substrat

343 mg BAEE werden mit Puffer auf 100 ml aufgefüllt; die Endkonzentration beträgt 0.01 M.

2.1.3 Lösliches Enzym

5 mg/ml bzw. 5 mg/10 ml (2×10^{-4} M bzw. 2×10^{-5} M) werden bei 0° C in 0.01 M HCl gelöst und über Nacht gegen 0.001 M HCl bei 4° C dialysiert. Die genaue Konzentration kann nach einer 1:10 Verdünnung bei 280 nm in 0.001 M HCl gemessen werden ($E^{1\%}_{1cm} = 15.4$). Die Testtemperatur betrug 26° C bei pH = 7.8. Der Enzymeinsatz entsprach 50 µl = 250 µg.

2.1.4 CM-Trypsin

4 mg/10 ml werden nach 10-minütigem Quellen in bidest H_2O während weiterer 10 Minuten auf den gewünschten pH eingestellt und in fest verschließbaren Gläßchen in Trockenschränken inkubiert (Enzymeinsatz 100 µl ≙ 0.04 mg).

2.1.5 MAL-Trypsin

40 mg/10 ml werden nach 8-minütigem Quellen für 4 Minuten mit Hilfe eines 10 ml Potters homogenisiert und über den Zeitraum von 8 Minuten auf den gewünschten pH eingestellt (Enzymeinsatz 100 µl ≙ 0.4 mg).

Die Meßbedingungen für die immobilisierten Enzyme waren 30° C pH 9.5. Das Substrat war das gleiche wie beim nativen Enzym. Die Messungen wurden mit einem pH-stat-Gerät von Radiometer, Kopenhagen, Modell TTTlc mit SBR 2c durchgeführt.

Wichtige Schalterstellungen am Titrator:	
Empfindlichkeit (proportional band)	0.1
Titrationsgeschwindigkeit (je nach Restaktivität)	meist 4% / REV
Papiervorschub	meist 5mm/ sec

pH 7.8, 9.5

Das Substrat wurde während der Messung mit St ckstoff durchperlt. Das temperierte Rührgefäß, in dem eine gleichmäßige Durchmischung mit einem Spezialmagnetrührer gewährleistet war, hatte ein Volumen von ca. 10 ml. Als Spritze hat sich eine 2 ml Kunststoff-Recordspritze bewährt, die mit einer Genauigkeit von 5,2% arbeitet. Vor jeder Messung wurde das Substrat von Kühlraumtemperatur auf Meßtemperatur gebracht. Vor der Enzymzugabe wurde in einem Zeitraum von 5 Minuten die Autolyse des BAEE titriert, und sofort von der durch die Enzymaktivität hervorgerufenen Steigerung subtrahiert. Diese wurde dann auf eine 0.1 N bzw. 0.01 N Natronlauge umgerechnet.

2.2 Photometrisch

Die optische Methode (39, 40) wurde für die Messung der Betriebsstabilität gewählt, weil bei der titrimetrischen Bestimmung ein konstanter pH in der Reaktionssäule während der Versuchsdauer nicht zu erreichen gewesen wäre. Dazu verwendeten wir einen thermostatisierbaren Säulenreaktor (0.5 cm^2, d = 0.8 cm, Temperatur 37° C, 50° C), der mit 4 mg einer CM-TRY-CM-Cellulose-Mischung beschickt war. Die Aktivitätsmessung erfolgte mit BAPA als Substrat in 0.05 M Tris, 0.02 M $CaCl_2$, pH = 8.2 (BAPA wurde zuerst in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst und dann mit dem Puffer auf 100 ml aufgefüllt). Trypsin spaltet von BAPA das p-Nitroanilin ab. Die Messungen erfolgten für das verbleibende BAPA bei 315 nm mit ε = 13.000 $M^{-1}cm^{-1}$, für das entstandene p-Nitroanilin bei 410 nm mit ε = 8.800 $M^{-1}cm^{-1}$ an einem Hitatchi UV-VIS Spectrophotometer 181. Durch

Addition der beiden so gewonnenen Konzentrationen läßt sich die Genauigkeit der Methode überprüfen.

Die Strömungsgeschwindigkeiten betrugen während der Meßperioden ≙ 45 Minuten Einstellzeit + 15 Minuten Sammelzeit 0.49 ml/min und 0.15 ml/min in der Zwischenzeit.

Zur Charakterisierung einer kontinuierlichen Anwendung für präparative Zwecke wurde 10^{-3} Mol/l BAPA (≙ K_m) (37) verwendet, als Vergleich für analytische Verwendungen 10^{-4} Mol/l.

3. Natives Trypsin

3.1 Aktivitätsabnahme in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur

Es kamen zwei verschiedene Testanordnungen zur Bestimmung der Lagerstabilität zur Anwendung:

1) Der Aktivitätsverlust wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit gemessen, wobei die Parameter Temperatur und pH variiert wurden (3.1.3):

Temperatur		25° C	37° C	50° C	60° C	70° C	80° C
pH	2.8	X	X	X	X	X	X
	7.6	X	X	X	-	-	-
	10.5	X	X	X	-	-	-

2) Die Aktivitätsänderungen wurden in pH-Schritten von einer pH-Einheit in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur (26° C, 30,2° C, 37° C, 50° C) nach 15 bzw. 60 Minuten In-

kubation gemessen (3.2).

3.1.1 Berechnung der Aktivität

Die Inaktivierung wird unter Zugrundelegung einer Reaktion II. Ordnung berechnet: $\frac{1}{A} - \frac{1}{A_o} = k \times t$ mit A_o als Anfangskonzentration zur Zeit t = 0 und mit A als Konzentration zur Zeit t. Die Konzentrationen zur Zeit t können nach Berechnung der spezifischen Aktivität direkt aus der Steigung der Titrationskurve erhalten werden.
1cm auf der Y-Achse des Schreibers (X-Achse ≙ t) entspricht 1 Skt des Titriergerätes, und 1Skt 0.0630 ± 0.0033 ml 0.1N NaOH. Demnach gilt für eine Steigung von 1cm/min eine Äquivalenz zu 6.3 µmol Produkt/min oder 6.3 Enzymeinheiten (U).

Bei einer Einwaage von 5 mg Trypsin/ml für Stabilitätsuntersuchungen wurden für jeden Test 50 µl = 0.25 mg Trypsin entnommen. Als durchschnittliche Steigung wurde gefunden:

$$1.5322 \pm 0.0709 \text{ cm/min}$$

$$\frac{1.5322}{0.25} \times 6.3 = 38.6 \text{ U/mg}$$

Rechnet man diese Werte auf molarer Basis um (Molekulargewicht von Rindertrypsin ~ 23,000), so ergibt sich aus der Einwaagekonzentration von 5 mg/ml eine Konzentration von 2.1×10^{-4} M mit einer Aktivität von 193 U/ml.

Die zur Zeit t noch aktive Enzymkonzentration berechnet man entsprechend unter Standartbedingungen unter Zugrundelegen

von 1cm/min = 1.37×10^{-4} M Trypsin.

3.1.2 Berechnung von A_o

Der Mittelwert sämtlicher 100%-Messungen betrug 1.532 ± 0.071cm mit einem Variationskoeffizienten $\frac{s}{x} \times 100 = 4.6\%$, wobei alle Werte im 2 α -Vertrauensbereich lagen.

$$A_o = (1.532 \pm 0.071)\ \text{cm} \times 1.37 \times 10^{-4}\ \text{M/cm}$$

$$A_o = (2.099 \pm 0.097) \times 10^{-4}\ \text{M}$$

$$\frac{1}{A_o} = 0.4764 \times 10^{+4}\ \text{M}^{-1}$$

Für 25° C pH = 2.8, 7.0, 10.5 bzw. 37° C pH = 7.0, 10.4 bzw. 50° C pH = 7.6, 10.6 betrug A_o' :

$$A_o' = (2.099 \pm 0.097) \times 10^{-5}\ \text{M}$$

$$\frac{1}{A_o'} = 0.4764 \times 10^{+5}\ \text{M}^{-1}$$

3.1.3 Auswertung der Meßergebnisse

Wie in 3.1.1 und 3.1.2 ausgeführt wurde, ist es möglich, mit Hilfe der gemessenen Steigung den Aktivitätsabfall grafisch und rechnerisch darzustellen. Um die kinetischen Parameter berechnen und eine Fehlerabschätzung durchführen zu können, wurden die Werte in eine linearisierte Form umgewandelt. Als Abszisse wurde die Zeit t (h) aufgetragen, als Ordinate

$\frac{1}{A} - \frac{1}{A_o}\ (\text{M}^{-1})$.

Für die Halbwertszeit gilt: $A = \frac{A}{2}o$; $t = \tau$, da $\frac{1}{A} - \frac{1}{A_o} = k \times t \triangleq \tau \times k = \frac{1}{A_o}$, wobei A_o der aus der Regression berechnete Achsenabschnitt ist.

Da bei den Versuchen mit pH ≠ 2.8 $A_{o\ \text{theoretisch}} \neq A_{o\ \text{berechnet}}$ gilt für die Halbwertszeit :

$$A = \frac{A_{o\ \text{berechnet}}}{2}$$

$$k \times \tau = \frac{1}{A} - \frac{1}{A_{o\ \text{theoretisch}}}$$

$$k \times \tau = \frac{2}{A_{o\ \text{berechnet}}} - \frac{1}{A_{o\ \text{theoretisch}}}$$

$$k \times \tau = b + \frac{1}{A_{o\ \text{berechnet}}}$$

Tabelle 1

Zeit (h)	korrigierte Steigung (cm)	Enzymkonz. x 10^{-4} M	$\frac{A \times 100\%}{A_{o\ \text{ber.}}}$	$\frac{1}{A} \times 10^{+4}\ M^{-1}$	$(\frac{1}{A} - \frac{1}{A}_{o\ \text{theor.}}) \times 10^{+4}\ M^{-1}$
0.0	1.4564	1.9953	99.1	0.5012	0.0248
4.9	1.5568	2.1328	106.0	0.4688	0.0075
16.5	1.4062	1.9265	95.7	0.5191	0.0427
21.1	1.3559	1.8576	92.3	0.5383	0.0619
25.0	1.3057	1.7888	88.9	0.5590	0.0826
30.2	1.2454	1.7062	84.8	0.5861	0.1097
40.0	1.0546	1.4448	71.8	0.6921	0.2157
44.5	0.9542	1.3073	64.9	0.7650	0.2886
48.0	0.9040	1.2385	61.5	0.8074	0.3310
54.0	0.7834	1.0733	53.3	0.9317	0.4553
66.0	0.4520	0.6192	30.8	1.6149	1.1385
0.0	1.4564	1.9953	99.1	0.5012	0.0248
6.0	1.4865	2.0365	101.2	0.4910	0.0246
5.0	1.4564	1.9953	99.1	0.5012	0.0248
11.0	1.1751	1.6099	80.0	0.6212	0.1448
18.5	1.3760	1.8851	93.7	0.5305	0.0541
19.0	1.3760	1.8851	93.7	0.5305	0.0541
30.8	1.2555	1.7201	85.5	0.5814	0.1050
37.0	1.2053	1.6513	82.0	0.6056	0.1292
56.3	0.6930	0.9494	47.2	1.0533	0.5769

NATIVES TRYPSIN

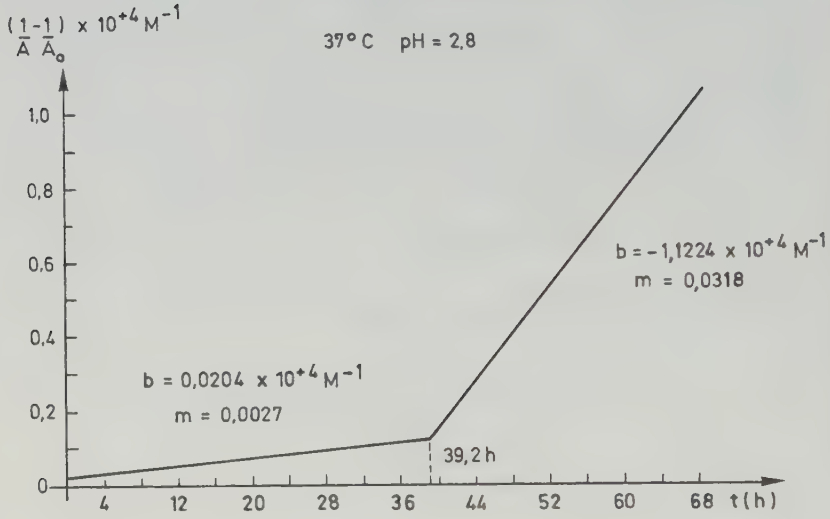


Abb. 2

NATIVES TRYPSIN

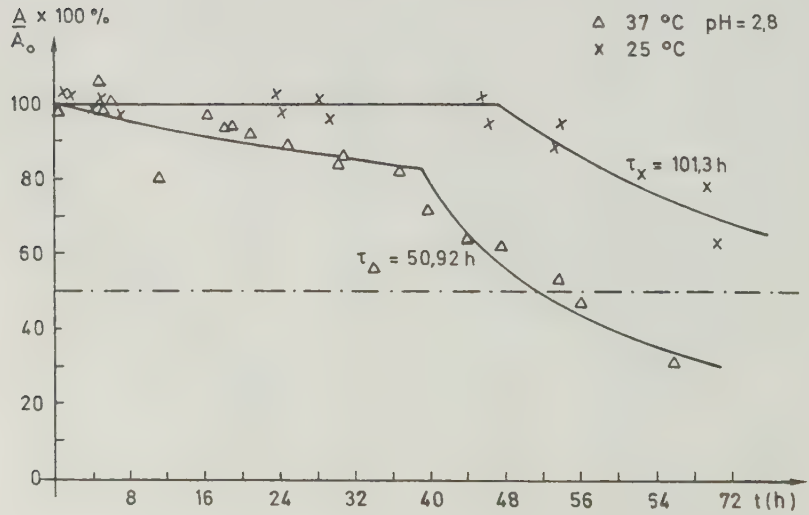


Abb. 3

Die Tabelle 1 gibt die Meßwerte bei 37° C, pH = 2.8 wieder. Daraus wurden zwei Regressionsgeraden gebildet, die sich bei t = 39.2 h schneiden (Abb. 2, 3). Aus den beiden Geraden lassen sich Wertepaare berechnen, die nach Rückrechnung in eine Enzymkonzentration zum Zeichnen der Aktivitätskurven dienen. In diesen theoretischen Kurven werden dann die gemessenen Wertepaare aus Tabelle 1 eingetragen. Die berechneten kinetischen Parameter HWZ $t_{1/2}$ (h), Geschwindigkeitskonstante k ($M^{-1} \times sec^{-1}$) und der für t = 0 aus der Regressionsgeraden erhaltene Wert $A_{o\ berechnet}$ finden sich für alle durchgeführten Bedingungen in Tabelle 2 + (Abb. 4, 5, 6, 7).

Tabelle 2

Temperatur	pH	$A_{o\ berechnet}$ (M)	$\frac{A_{o\ berechnet}}{A_{o\ theoretisch}} \times 100\%$	τ (h)	m = k
25.0° C	2.8	12.3533×10^{-6}	58.9	101.30	0.0000
					0.0150
	7.0	13.0293×10^{-6}	62.1	12.58	0.0610
	10.5	3.3083×10^{-6}	15.8	4.30	0.7020
37.0° C	2.8	2.0129×10^{-4}	95.9	50.92	0.0027
					0.0318
	7.0	3.5180×10^{-6}	16.8	14.98	0.1897
	10.4	2.6226×10^{-6}	12.5	1.47	2.5889
50.0° C	2.8	1.9751×10^{-4}	94.1	14.99	0.0009
					0.0443
	7.6	6.1584×10^{-6}	29.3	0.52	3.1200
	10.6	-	-	-	15.3509
60.0° C	2.8	2.1911×10^{-4}	104.4	2.63	0.0737
					0.4390
70.5° C	2.8	2.5233×10^{-4}	120.2	0.95	0.3066
					5.4134

+ Bei 80° C ergab sich k = 0.0925 mit einer berechneten Halbwertszeit $t_{1/2}$ = 6.53 h. Dies ist wahrscheinlich die Folge von Konformationsänderungen in Form von einer reversiblen Denaturierung während der Inkubation (16, 21).

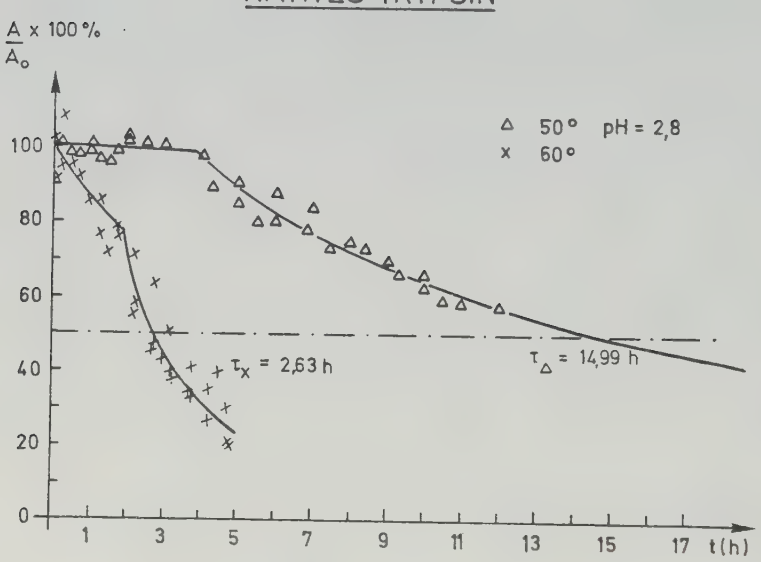

NATIVES TRYPSIN
A x 100 %
A₀
△ 50° pH = 2,8
x 60°
τx = 2,63 h
τ△ = 14,99 h
100
80
60
40
20
0
1
3
5
7
9
11
13
15
17
t(h)

Abb. 4

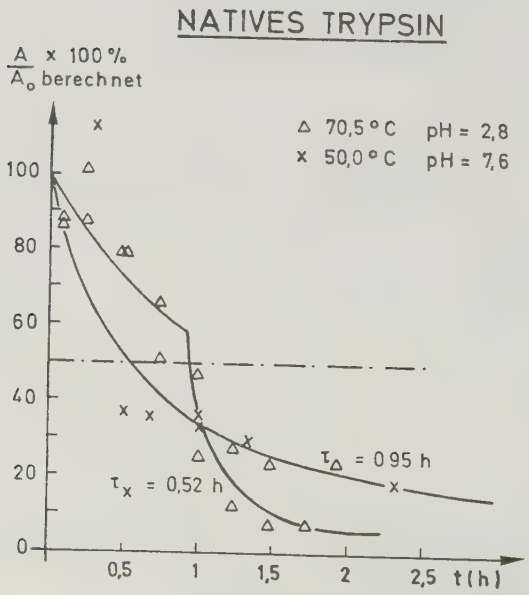

NATIVES TRYPSIN
A x 100 %
A₀ berechnet
△ 70,5 °C pH = 2,8
x 50,0 °C pH = 7,6
τ△ = 0,95 h
τx = 0,52 h
100
80
60
40
20
0
0,5
1
1,5
2
2,5
t(h)

Abb. 5

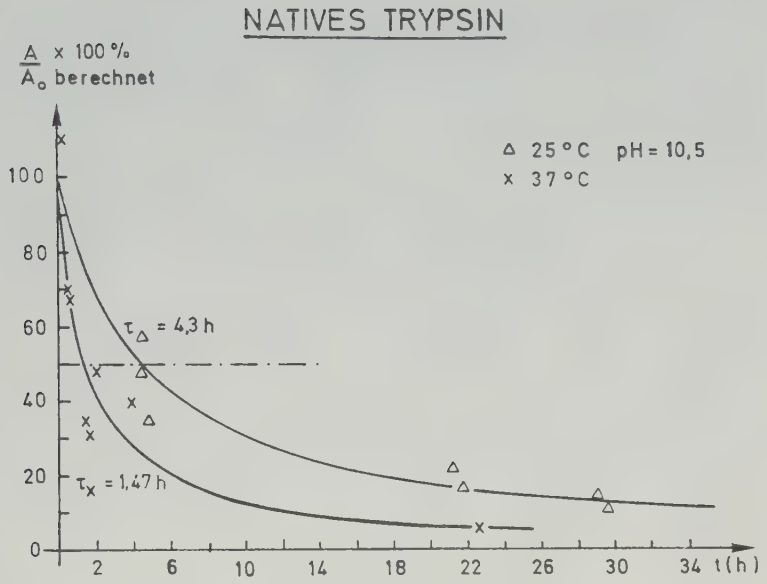

NATIVES TRYPSIN
A x 100 %
A₀ berechnet
△ 25 °C pH = 10,5
x 37 °C
τ△ = 4,3 h
τx = 1,47 h
100
80
60
40
20
0
2
6
10
14
18
22
26
30
34 t(h)

Abb. 6

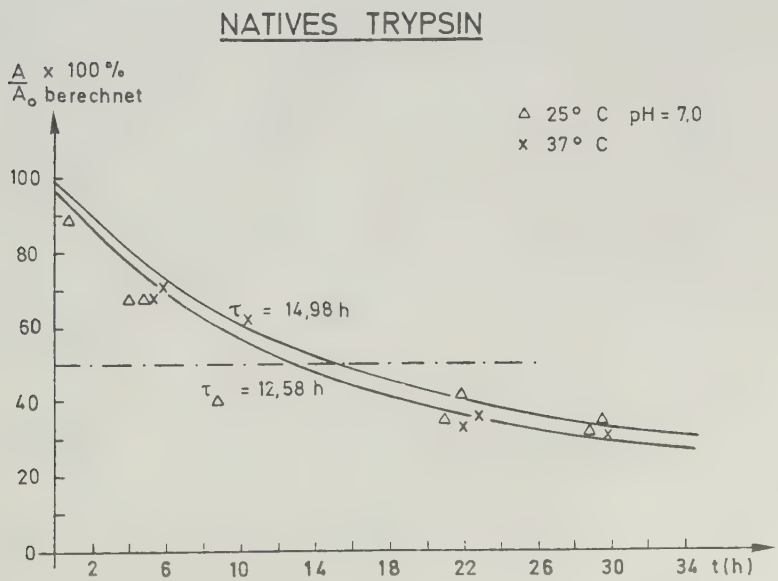

NATIVES TRYPSIN
A x 100 %
A₀ berechnet
△ 25° C pH = 7,0
x 37° C
τx = 14,98 h
τ△ = 12,58 h
100
80
60
40
20
0
2
6
10
14
18
22
26
30
34 t(h)

Abb. 7

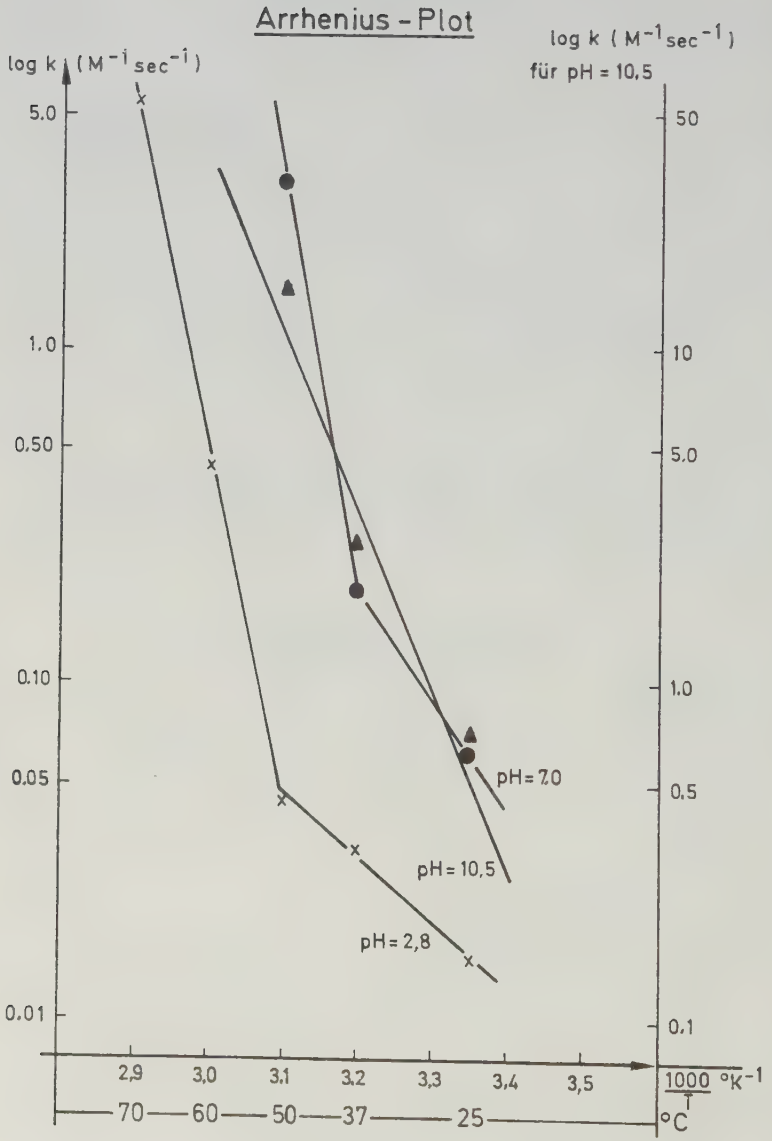

Arrhenius - Plot
log k (M⁻¹ sec⁻¹)
log k (M⁻¹ sec⁻¹)
für pH = 10,5
5.0
1.0
0.50
0.10
0.05
0.01
50
10
5.0
1.0
0.5
0.1
pH = 7.0
pH = 10,5
pH = 2,8
2,9
3,0
3,1
3,2
3,3
3,4
3,5
1000 °K⁻¹
70
60
50
37
25
°C

Abb. 8

$A_{o\ berechnet}$ wurde als 100%-Wert für die Kurven zugrunde gelegt (Abb. 4, 5, 6, 7). Dies ist notwendig, da durch die Inkubation bei verschiedenen pH-Werten unterschiedliche Grundaktivitäten für das anschließend bei Standardbedingungen getestete Enzym auftreten. Dies wird auf bekannte Konformationsübergänge bzw. -zustände zurückgeführt (Abb. 8).

Die Halbwertszeiten (Tab. 2) nehmen innerhalb einer Temperatur mit stärker werdender Alkalisierung ab. Die prozentuale Abnahme mit $t_{1/2\ pH = 2.8} \triangleq 100\%$ innerhalb eines Bereiches ist relativ konstant, im Vergleich der Temperaturen untereinander nimmt sie von 25° C nach 50° C stark zu.

3.2 Aktivitätsabnahme in Abhängigkeit vom pH

Wie bereits in 3.1 erwähnt, wurde die pH-abhängige Stabilität in Schritten von einer pH-Einheit bei 26° C, 30.2° C, 37° C und 50° C aufgenommen. Die Inkubationszeit betrug bei allen Messungen 15 und 60 Minuten. Die aufgenommenen Kurven (Abb. 9, 10, 11, 12) zeigen kein zweites Maximum der Stabilität im alkalischen Bereich (19). Die pH-Werte der 50%-Restaktivität nach 15 bzw. 60 minütiger Inkubation sind in Tabelle 3 zusammengestellt:

Tabelle 3

Temperatur	15 min	60 min
26.0° C	7.4	6.8
30.2° C	7.4	7.0
37.0° C	6.5	5.7
50.0° C	4.8	4.2

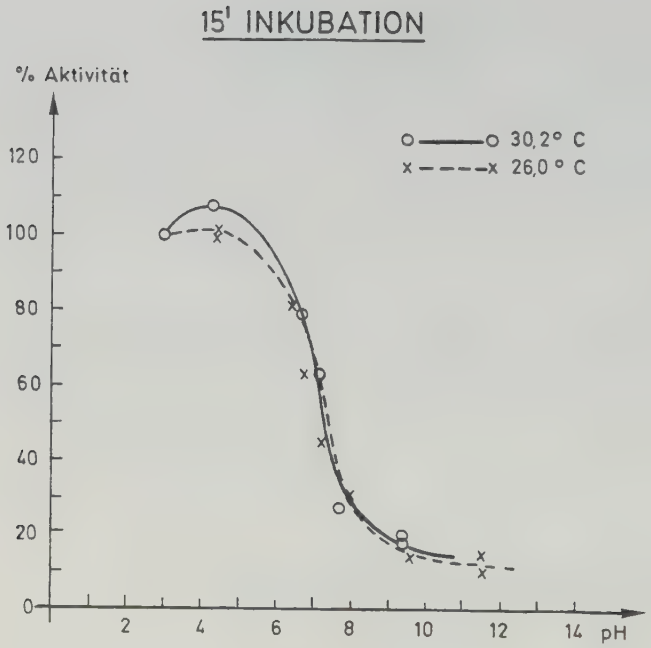

15' INKUBATION
% Aktivität
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
12
14
pH
30,2° C
26,0 ° C

Abb. 9

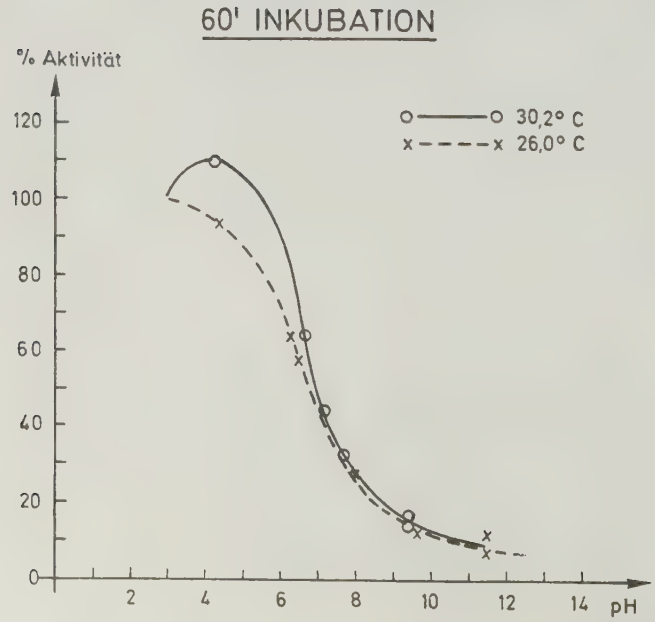

60' INKUBATION
% Aktivität
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
12
14
pH
30,2° C
26,0° C

Abb. 10

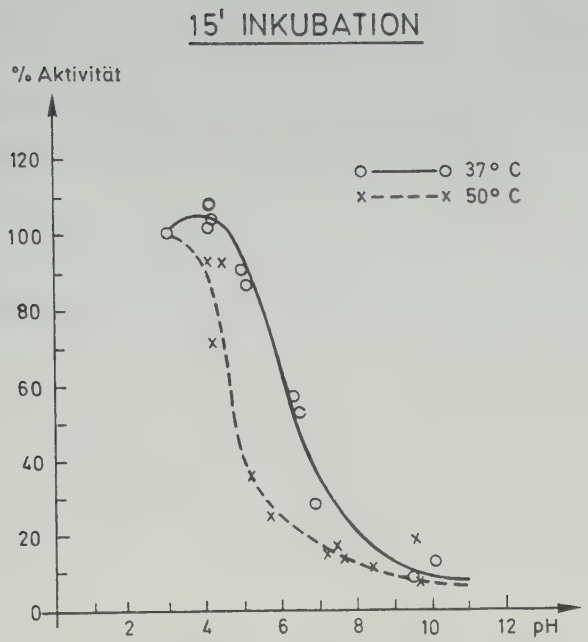

15' INKUBATION
% Aktivität
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
12 pH
37° C
50° C

Abb. 11

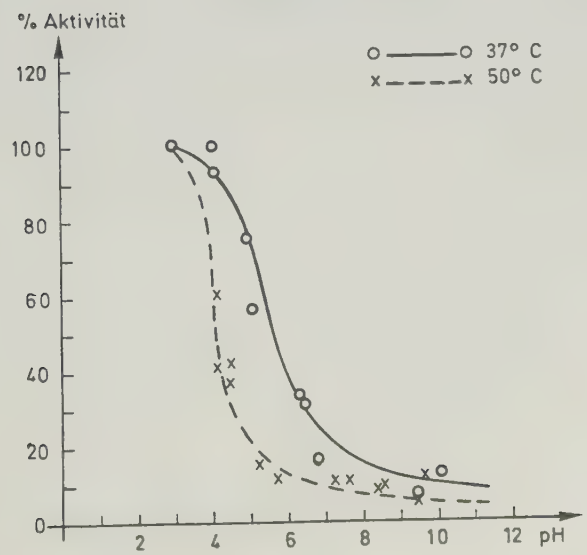

60' INKUBATION
% Aktivität
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
12 pH
37° C
50° C

Abb. 12

Der pH-Wert der 50% Restaktivität verschiebt sich mit steigender Temperatur zu niederen Werten (pH gemessen bei 25° C). Bei 30.2° C und 37° C zeigt sich nach 15 minütiger Inkubation eine geringe Zunahme der katalytischen Aktivität über den A_o-Wert im Bereich von pH = 4.

4. Immobilisiertes Trypsin

Bei den immobilisierten Trypsin-Präparaten wurde im Gegensatz zum nativen Enzym neben der Lagerstabilität auch die Betriebsstabilität in Säulenreaktoren untersucht.

4.1 Aktivitätsabnahme in Abhängigkeit von Zeit, Temperatur und pH

Wie schon beim nativen Enzym wurde versucht, die temperaturabhängige Stabilität bei verschiedenen pH-Werten zu charakterisieren, indem man bei Inkubationszeiten von 15 und 60 Minuten den Aktivitätsverlust in Schritten von einer pH-Einheit aufnahm. Die untersuchten Bedingungen waren für CM-Trypsin 37° C und 50° C, für MAL-Trypsin 37° C und 70° C. Dabei zeigte sich, daß die Aktivitätsabnahme nach 15 bzw. 60 Minuten Inkubation bei allen untersuchten Temperaturen in Form einer pH-Optimum-Kurve auftrat. Dies bedeutet, daß die gewählten Bedingungen von Temperatur und Inkubationszeit nicht ausreichten, eine zusätzliche Denaturierung zu bewirken.

Um Bedingungen zu ereichen, die eine Aussage über die pH- und

temperaturabhängige Lagerstabilität erlauben würden, wurden Verlaufsmessungen der Enzymaktivität mit CM-Trypsin und MAL-Trypsin bei 37° C und 50° C bei pH = 2.0, 7.6 und 10.3 über einen Zeitraum von 30 Tagen durchgeführt.

Als Beispiel sei MAL-Trypsin bei 50° C, pH = 8.6 gewählt (Abb.13, 14). Die gemessenen Steigungen pro Minute sind, wie in 3.1.1 ausgeführt wurde, ein Maß für die Restaktivität der Enzymlösung nach der Inkubation. Die gemessene Steigung m' wurde wie beim löslichen Enzym auf eine theoretische 0.01 N NaOH berechnet und man erhielt die "korrigierte" Steigung m. Da es bei den Aktivitätsmessungen nicht auf die absolute Aktivität (U/mg) ankam, sondern nur auf die Aktivitätsänderung und da die immobilisierten Enzyme nach der I. Reaktionsordnung reagieren, konnte man nur mit der gemessenen Steigung m arbeiten.

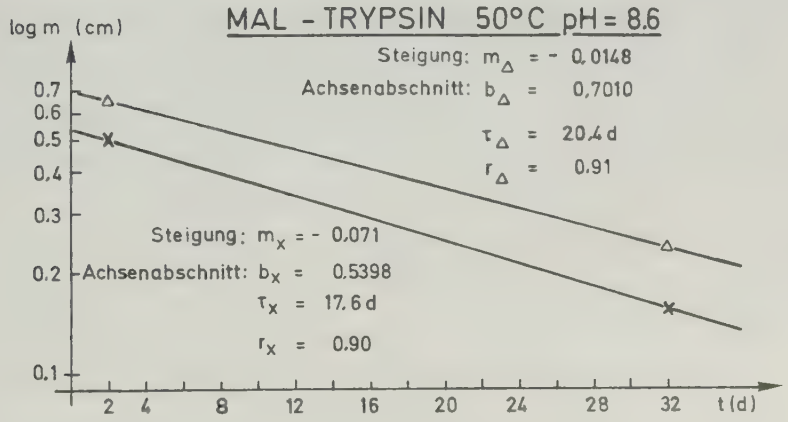


Abb. 13

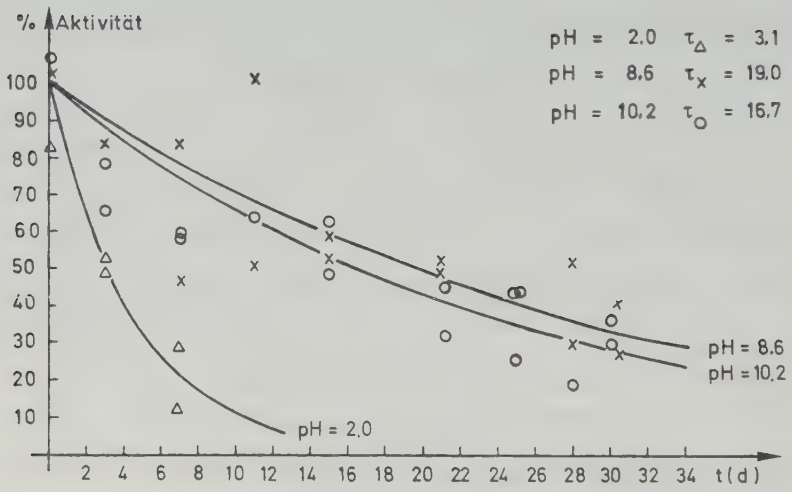


Abb. 14

Zur Aufstellung einer Regression wurde als Abszisse die Zeit t (d) gewählt, als Ordinate der Logarithmus der korrigierten Steigung m. Für die prozentuale Auftragung diente $m_{t=0}$ als 100%. Die Abbildungen 13, 14, 15, 16, 17, 18 ergeben den gemittelten Verlauf von Doppelmessungen wieder. Während beim CM-Trypsin bei pH = 7.6 und 10.6 bei 37° C im beobachteten Zeitraum keine Aktivitätsverluste eintraten, können Bereiche höherer Temperatur (50° C) (Abb. 17) oder pH-Instabilität (pH = 2.0) (Abb. 16) für vergleichende Kriterien über die Stabilität herangezogen werden. Das unter gleichen Versuchsbedingungen getestete MAL-Trypsin besitzt geringere Stabilitäten bei 37° C sowohl im Bereich von pH = 8 bis 10 als auch bei pH = 2 (Abb. 15). Für den Temperaturbereich von 50° C gilt analoges (Abb. 14)

MAL TRYPSIN 37° C

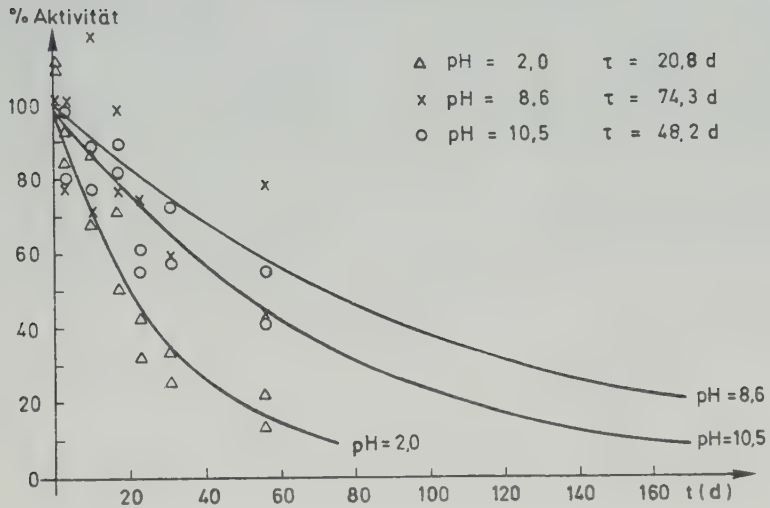


Abb. 15

CM-TRYPSIN 37° C

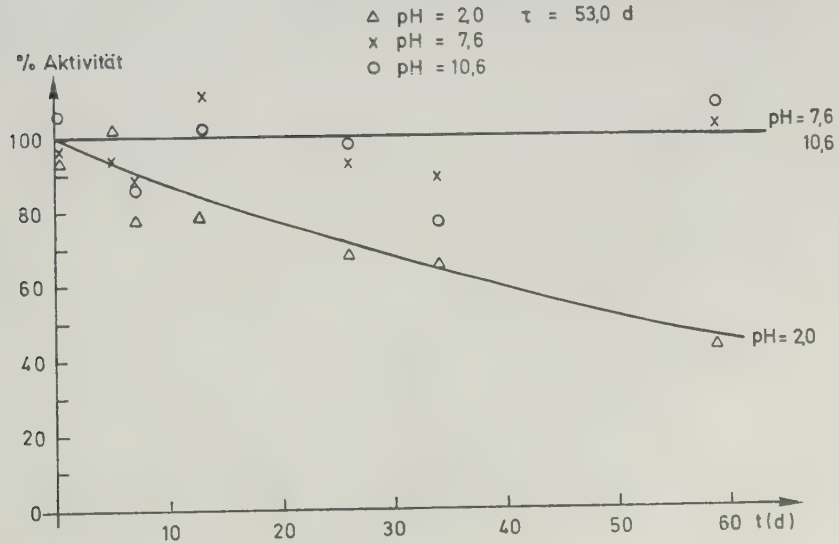


Abb. 16

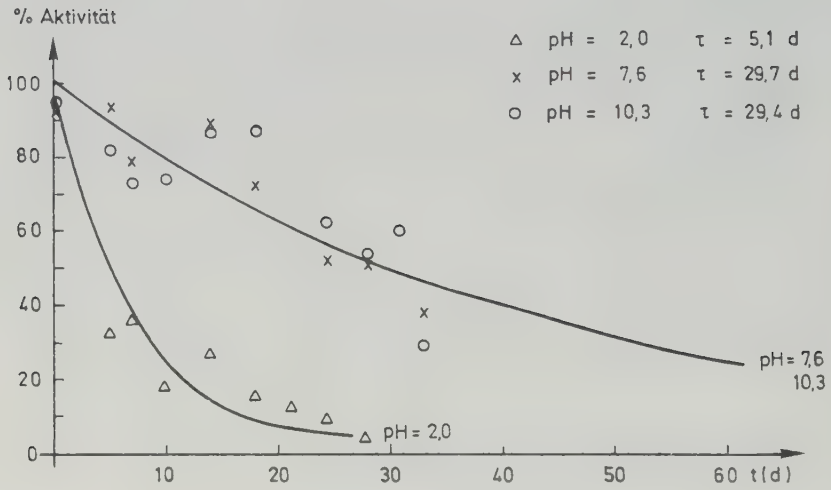


Abb. 17

Die ermittelten Halbwertszeiten $t_{1/2}$(d) und die Geschwindigkeitskonstanten k (sec^{-1}) sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengestellt.

Tabelle 4

Halbwertszeiten $t_{1/2}$(d):

pH		2.0	7.6 (8.6)	10.6
37° C	CM-Trypsin	53.0	--	--
	MAL-Trypsin	20.8	72.5	48.2
50° C	CM-Trypsin	5.1	29.7	29.4
	MAL-Trypsin	3.1	19.0	16.7

Tabelle 5

k (sec^{-1})

pH		2.0	7.6 (8.6)	10.6
37° C	CM-Trypsin	0.0131	--	--
	MAL-Trypsin	0.0338	0.0100	0.0144
50° C	CM-Trypsin	0.1363	0.0233	0.0235
	MAL-Trypsin	0.2280	0.0367	0.0421

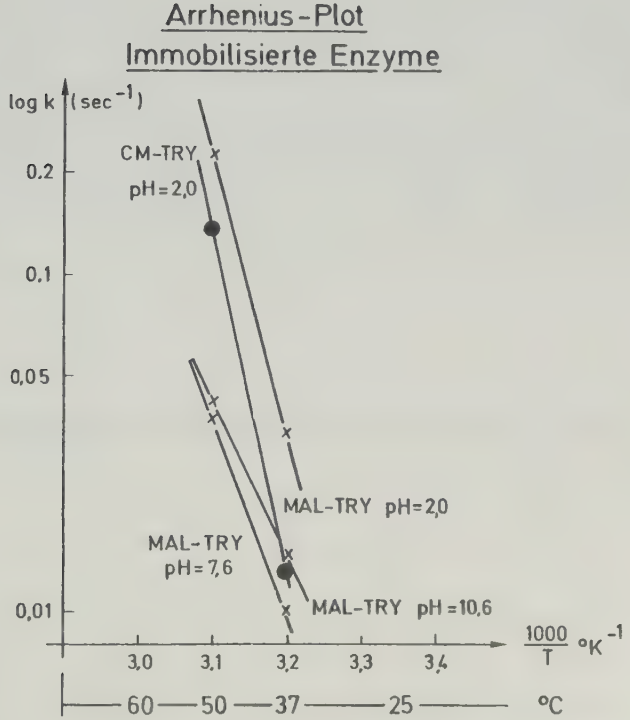


Abb. 18

4.2 Aktivitätsabnahme in Gegenwart von Substrat

4.2.1 Abhängigkeit des Umsatzes von der Durchflußgeschwindigkeit

Je 4 mg CM-Trypsin und 96 mg CM-Cellulose wurden 20 Minuten in 10 ml H_2O suspendiert und vier Säulen gefüllt. Die geprüften Substratkonzentrationen waren 10^{-3} M bzw. 10^{-4} M BAPA. Die Pumpen liefen mit drei verschiedenen Geschwindigkeiten: 0.72 ml/min, 0.49 ml/min und 0.15 ml/min. Die Durchflußraten hatten einen Variationskoeffizienten von 4.3% bis 8.7%. Die Sammelzeit betrug 15 Minuten, für die ein konstanter Umsatz angenommen wurde. Als Reaktionstemperatur wurde 37° C gewählt.

Tabelle 6

Strömungsgeschwindigkeit v (ml/min)	Gesamtkonz. (M)	Umsatz x 10^{-4} M/min	Produktbildung in % der Gesamtkonz.
0.72	10^{-3}	5.34	50.6
0.49		7.13	63.9
0.15		8.42	78.0
0.72	10^{-4}	8.33	66.4
0.49		8.33	66.6
0.15		9.79	78.3

In Tabelle 6 ist für einige Strömungsgeschwindigkeiten der prozentuale Umsatz angegeben. Mit zunehmendem Durchfluß und damit mit verringerter Verweildauer des Substrats im Säulenreaktor sinkt der Substratumsatz. Der Abfall der Produktmenge ist bei großen Durchflußraten und bei großen Substratkon-

zentrationen am deutlichsten (Abb. 19)

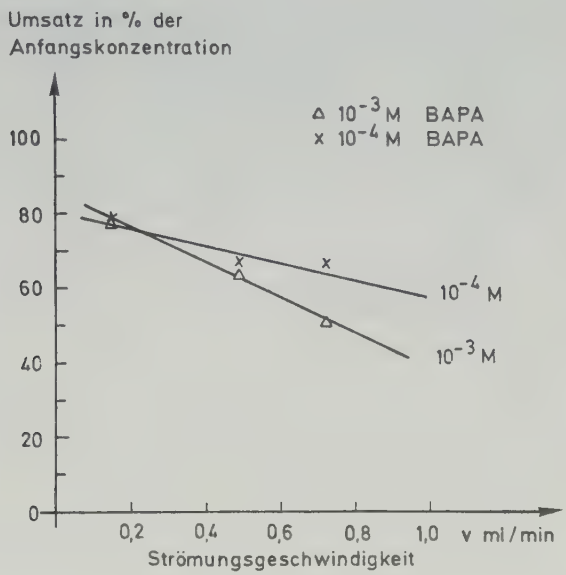


Abb. 19

4.2.2 Aktivitätsabnahme in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur

Während der Meßperioden betrug bei einer Stömungsgeschwindigkeit von 0.49 ml/min die Produktbildung 64% des eingesetzten Substrats, in der Zwischenzeit bei einer Geschwindigkeit von 0.15 ml/min 78%.

Die Restaktivität wurde in diesem Falle photometrisch ermittelt. Zur Linearisierung wurde logE gegen die Zeit t aufgetragen. Berechnete Punkte aus dieser Regression wurden zur Dar-

stellung der Kurven benutzt, in welche die Meßpunkte eingetragen wurden. $E_{410\ nm}$ für t = 0 entsprach der 100%-Aktivität.

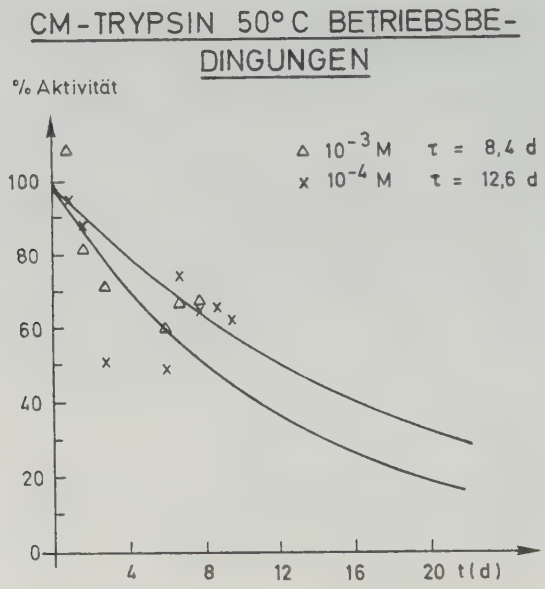


Abb. 20

Bei 37° C war bei beiden verwendeten Substratkonzentrationen während der Versuchsdauer von fast 14 Tagen kein Abfall der Anfangsaktivität festzustellen. Der Variationskoeffizient betrug 5.38% (10^{-3} M BAPA) bzw. 4.2% (10^{-4} M BAPA) für die Meßwerte bei 315 nm.

Bei 50° C ergaben sich Halbwertszeiten $t_{1/2}$= 8.4 d (10^{-3} M BAPA) und $t_{1/2}$= 12.64 d (10^{-4} M BAPA) (Abb. 20). Damit ist die Betriebsstabilität, wie erwartet, deutlich geringer als die Lagerstabilität.

III. DISKUSSION

Der Vergleich der Stabilität einer nativen Protease mit verschiedenen trägergebundenen Derivaten hebt auf der einen Seite die besonderen Vorteile der Immobilisierung - und damit der Einschränkung der Autoproteolyse - hervor, zum anderen ist die Entwicklung eines Modells über die Denaturierung immobilisierter Enzyme eher erschwert.

Kristallisiertes Trypsin ist bei trockener Lagerung stabil (kein Abfall der Aktivität bei Lagerung bei 4° C innerhalb 18 Monaten lt. Hersteller). Kristalle stellen die einfachst mögliche Form einer physikalischen Immobilisierung dar. Daher sollte die vorliegende Untersuchung nicht einseitig als Hervorhebung von Vorteilen kovalent an Trägerteilchen gebundener Proteasen verstanden werden. Das Ziel ist vielmehr, wie vorstehend beschrieben, über vergleichende Stabilitätsuntersuchungen Einblicke in wesentliche Kriterien des Stabilitätsverhaltens verschiedener Formen zu gewähren.

1. Stabilität des nativen Trypsins in Lösung

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen liegt das Stabilitätsoptimum bei pH = 2.3 (19) mit zunehmender Instabilität, wenn man diesen Bereich verläßt (20). Die unseren Messungen zugrunde gelegte höhere Enzymkonzentration (2×10^{-5} M bis 2×10^{-4} M gegenüber 1.4×10^{-7} M) zeigt, bei sonst gleichsin-

nigem Verhalten, deutlich den erwarteten Effekt einer Autoproteolyse im Bereich $3 \leqslant pH \leqslant 13$, d.h. die Abhängigkeit von der II. Reaktionsordnung. Die pH-abhängige Deprotonierung einer oder weniger Gruppen dürfte zur Bildung der enzymatisch aktiven Form des Trypsins führen, deren Konzentration noch bis $pH > 10$ zunimmt. Dies wird aus dem titrationsartigen Verlauf der Stabilität geschlossen (Abb. 9, 10, 11, 12). Da die Dissoziation mit steigenden Temperaturen im allgemeinen zunimmt, wird eine Verschiebung der Stabilität nach saurem pH erwartet und gefunden (Tabelle 3). Die Kurzlebigkeit des Enzyms in Lösung ließ außer der auf Autoproteolyse zurückgeführten Instabilität keine anderen Mechanismen eines Aktivitätsverlustes erkennen.

Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit weist allerdings darauf hin, daß möglicherweise unterschiedliche Konformationen bei tiefer und hoher Temperatur die Umwandlung in den aktiven Zustand kontrollieren (16, 22).

Eine höhere Aktivierungsenergie kann auch auf kooperative Effekte (Proteinentfaltung) zurückgeführt werden. Dieser Effekt könnte sowohl das Enzym als Katalysator wie auch als Substrat betreffen.

2. Stabilität von immobilisiertem Trypsin

Auch die im Handel befindlichen und hier verwendeten immobilisierten Trypsinderivate zeigen bei der vom Hersteller vorge-

sehenen Lagerung keinen Aktivitätsverlust nach einem Jahr. Für die vergleichende Stabilitätsuntersuchung wurde das immobilisierte, partikuläre Material unter gleichen Bedingungen wie das lösliche Trypsin untersucht. In Anbetracht der durch das Experiment überprüften I. Reaktionsordnung des Aktivitätsabfalls, geht die Konzentration des Enzyms nicht in die Auswertung der kinetischen Konstanten ein. Daher ist es nicht notwendig, die Konzentration des Proteins und den unbekannten Anteil aktiver Enzymmoleküle zu bestimmen.

Im Unterschied zum löslichen Enzym fällt bei der pH-Abhängigkeit der Stabilität ein Optimum im neutralen und schwach alkalischen Bereich auf (8, 21, 26, 29). Wir interpretieren dies als Ausdruck einer unter physiologischen Bedingungen stabilen Konformation, die gleichzeitig die optimal aktive Konformation darstellt. Es sollte beachtet werden, daß sowohl der CM-Celluloseträger als auch der Maleinsäureanhydridträger einen Überschuß an negativer Ladung besitzen, die ihrerseits Einfluß auf das pH-Optimum des immobilisierten Trypsins, wahrscheinlich auch auf die Konformationsstabilität, nehmen. Der IEP des Komplexes könnte bei niedrigerem pH als dem des löslichen Trypsins (IEP = 10.8) erwartet werden.

Bereits ein grober Überblick zeigt, daß die vergleichenden Untersuchungen a) bei 2 Temperaturen, b) bei 3 pH-Werten und c) mit 2 verschiedenen, anionischen Trägern sich nicht zu einfach extrapolierbaren Gesetzmäßigkeiten zusammenfassen lassen.

Als Vorteil stellt sich heraus, daß sich der günstigste pH-Bereich für die Lagerung in Suspension nicht wesentlich von den

Operationsbedingungen unterscheidet, jedoch übertrifft die Lagerstabilität die Betriebsstabilität.

3. Betriebsstabilität des immobilisierten Trypsins

Immobilisierte Trypsine der hier verwendeten Art zeigten verringerte Stabilität in Gegenwart von Substrat. Die Halbwertszeiten sind in Gegenwart von Substrat um den Faktor 2 - 4 verkürzt, wobei mit abnehmender Substratkonzentration die Halbwertszeiten zunehmen. Die Untersuchungen sollten zur Standardisierung von Stabilitätsangaben bei hohen und niedrigen Substratkonzentrationen und ca. 50% Umsatz vorgenommen werden. Tatsächlich stellt eine Konzentration von 10^{-3} M ($\triangleq$ 350 mg/l) keine hohe Konzentration für eine Produktoptimierung dar, sie reicht jedoch aus, um lösliches Enzym zu sättigen (K_m = $= 0.939 \times 10^{-3}$ M) (39).

Vergleiche mit bereits technisch durchgeführten Prozessen machen eine vorsichtige Interpretation des Abfalls der Aktivität des immobilisierten Trypsins bei erhöhten Temperaturen notwendig. Demnach ist die bakterielle Kontamination bei Betriebstemperaturen $< 65^{\circ}$ C einer der Hauptfaktoren für den Verlust von Aktivität (42). Wenn aber dies der Fall wäre, würden die hier wiedergegebenen Werte noch zu niedrige Angaben über die Stabilität darstellen.

IV. EMPFEHLUNGEN FÜR DIE STANDARDISIERUNG VON STABILITÄTSANGABEN

1. Definition eines Standard-Assays

Die spezifische Aktivität löslicher Enzyme sollte bei 25° C unter optimierten Bedingungen gemessen werden. Dazu gehört Substratsättigung, pH-Optimum, definierte Ionenstärke, Effektoren sowie Vorinkubation, falls nötig.

Optimierte Bedingungen für immobilisierte Enzyme müssen für das spezielle Enzym ermittelt werden. Analytische Methoden und die Ermittlung von Enzymkonstanten sind in (43) beschrieben. Zum Vergleich mit dem löslichen Enzym oder ganzen Zellen sollten die Aktivitätsbestimmungen bei 25° C oder 37° C vorgenommen werden und können mit den Daten bei der Temperatur der technischen Anwendung ergänzt werden. Auch hier sollte, falls nötig, eine Vorinkubation stattfinden, um die tatsächliche Aktivität zu erreichen (44).

Die Bestimmung einheitlicher Werte für das Stabilitätsverhalten wird hauptsächlich durch zwei Eigenschaften immobilisierter Enzyme eingeschränkt: erstens von der physikalischen und chemischen Inhomogenität der Struktur und Qualität der immobilisierten Enzyme, und zweitens durch den Einfluß der Diffusion. Unter praktischen Bedingungen erhält man daher Werte für den Bruchteil der an der Katalyse teilnehmenden Enzymmoleküle, während die theoretische katalytische Aktivität aller Enzymmoleküle nicht unmittelbar erfaßt werden kann (43). Deshalb

müssen standardisierte Teste optimiert werden in Bezug auf Rühren oder Durchflußraten, der Größenverteilung der Teilchen und niedrigem Umsatz bei Substratsättigung.

2. Testbedingungen für die Lagerstabilität

Die Lagerstabilität sollte man auf eine Reihe festgelegter Temperaturen: unter 0° C, 4° C, 25° C, 37° C oder 50° C beziehen. Zusätzlich könnte sie bei der Temperatur angegeben werden, die für die technische Nutzung wichtig ist. Für Reaktionen, die der I. Reaktionsordnung folgen, ist als Referenzwert die Halbwertszeit $t_{1/2}$ besonders gut geeignet ($k = \frac{2.303}{t} \log \frac{N}{N_o}$; $t_{1/2} = \frac{0.69}{k}$). Für die Praxis mag diese Art der Bestimmung zu langwierig sein, sodaß die Angabe der Aktivität nach einer charakteristischen Zeit, z.B. $t_{90\%}$ für die Charakterisierung ausreichen sollte.

Weiter sollte man angeben: physikalischen Zustand, Zusammensetzung der Lösung, Stabilisatoren und Zusätze gegen bakterielle Verunreinigung.

Um das Stabilitätsverhalten gegenüber pH, Ionenstärke usw. darzustellen, sollten Normogramme verwendt werden.

3. Testbedingungen für die Betriebsstabilität

Da die heute angebotenen Enzyme schon eine Haltbarkeit von M naten oder länger erreichen, ist die Angabe der Stabilität unter Betriebsbedingungen für wichtiger als die Lagerstabilität zu erachten. Die Betriebsbedingungen sind aber als ein Kompromiß zwischen anderen Dingen, vor allem Kostenfaktoren, zu sehen, zu denen die Stabilitätsforderung noch hinzutritt. Standardbedingungen und die Angabe von Veränderungen in Abhängigkeit von pH, Ionenstärke usw. können als Grundlage für eine Gesamtoptimierung dienen.

Um unter Testbedingungen zusätzliche Störungen, wie z.B. durch Abrieb, zu vermeiden, würde sich eine thermostatisierte Testsäule anbieten. Diese müßte einen definierten Durchmesser besitzen. Die Füllhöhe ergibt sich aus den folgenden Angaben. Als Beladung kann immobilisiertes Enzym oder eine Mischung aus Enzym und Trägermaterial dienen. Die Anfangskonzentration des immobilisierten Enzyms und das Durchflußvolumen müßten einen Umsatz von 10 - 90% des eingesetzten Substrats ergeben, bei einem Volumenfluß von > 2 cm/min. Während der Messung könnte die Durchflußgeschwindigkeit so verringert werden, daß der Substratumsatz auf 90% ansteigen könnte.

Als Temperaturschritte wären 25° C, 50° C und 65° C geeignet oder ein Grenzwert, der durch die Temperaturstabilität festzulegen wäre (45).

Als Substratkonzentrationen werden (S) = K_m für analytische und (S) = 10 K_m für präparative Aufgaben vorgeschlagen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1) MOSBACH, K.
(1976) FEBS-Letters 62, Supplement E 80 - E 95

2) SUNDARAM, P.V., PYE, E.K.
(1972) Enzyme Engeneering 2, 449 - 452

3) AXEN, R., PORATH, J., ERNBACK, S.
(1967) Nature 214, 1302

4) WEETALL, H.H.
(1973) Biomaterial Support, Corning Biological Products Department, Medfield, Mass., USA

5) KICKS, G.P., UPLIKE, S.J.
(1960) Anal. Chem. 38, 726

6) MOSBACH, K., MOSBACH, R.
(1966) Acta Chem. Scand. 20, 2807

7) EPTON, R., THOMAS, T.H.
(1971) An Introduction To Water-Insoluble Enzymes, Koch - Light Lab., Ltd Colnbrook, England

8) LEVIN, Y., PECHT, M.
(1964) Biochem. 3, No. 12, 1905 - 1912

9) GUILBAULT, G.G.
(1971) Pure Appl. Chem. 25 (4), 727

10) CLARK, C.L.
(1970) US Patent 3, 539, 455

11) MOSBACH, K., DANIELSON, B., BORGERUD, A., SCOTT, M.
(1975) Biochim. Biophys. Acta 403, 256 - 265

12) HORNBY, W.E., CAMPBELL, J., INMAN, D.J., MORRIS, D.L.
(1974) Enzyme Engeneering 2, 401

13) CHANG, T.M.S.
(1977) Biomedical Appl. of Immobilized Enzymes and Proteins Vol. 1, Plenum Press New York, 47

14) KEIL, B.
(1971) The Enzymes 3, 249 - 275

15) SCHWERT, G.W., NEURATH, H., KAUFMAN, S., SNOKE, J.E.
(1947) J. Biol. Chem. 172, 221 - 239

16) GABEL, D., KASCHE, V.
(1972) Biochem. and Biophys. Res. Com. 48, No. 4, 1011 - 1018

17) KEIL-DLOUHA, V., ZYLBER, N., IMHOFF, J.-M., TONG, N.-T., KEIL, B.
(1971) FEBS-Letters 16, No. 4, 291 - 295

18) BRÜMMER, W., HENNRICH, N., KLOCKOW, M., ORTH, H.D.
(1972) Europ. J. Biochem. 25, 129 - 135

19) KUNITZ, M., NORTHROP, J.H.
(1933) J. Gen. Physiology 17, 591 - 615

20) WANG, S.S., CARPENTER, F.H.
(1967) Biochem. 6, 215

21) TERMINIELLO, L., BIER, M., NORD, F.F.
(1958) Arch. of Biochem. and Biophys. 73, 171 - 179

22) LAZDUNSKI, M., DELAAGE, M.
(1967) Biochim. et Biophys. Acta 140, 417 - 434

23) GABEL, D., KASCHE, V.
(1973) Acta Chem. Scand. 27, 1971 - 1981

24) SCHWERT, G.W., EISENBERG, M.A.
(1949) J. of Biol. Chem. 179, 665 - 673

25) SIPOS, T., MERKEL, J.R.
(1970) Biochem. 9, No. 14, 2766 - 2775

26) BAR-ELI, A., KATACHALSKI, E.
(1963) J. of Biol. Chem. 238, No. 5, 1690 - 1698

27) HORNBY, W.E., LILLY, M.D.
(1968) Biochem. J. 107, 669 - 674

28) GOLDSTEIN, L., LEVIN, Y., KATCHALSKI, E.
(1964) Biochem. 3, No. 12, 1913 - 1919

29) GOLDSTEIN, L., PECHT, M.
(1970) Biochem. 9, No. 11, 2328 - 2333

30) ZABORSKY, O.R.
(1973) Immobilized Enzymes, CRC Press, Cleveland, Ohio

31) KELLY, N., FLYNN, A., JOHNSON, D.B.
(1977) Biotechnol. Bioeng. 13, 337

32) BENDER, M.L., KILLHEFFER, J.V., ROESKE, R.W.
(1965) Biochem. and Biophys. Res. Com. 19, No. 2, 161 - 165

33) BENDER, M.L., et al.
(1966) J. Amer. Chem. Soc. 88, 5890 - 5913

34) CHASE, Th., SHAW, E.
(1967) Biochem. and Biophys. Res. Com. 29, No. 4, 508 - 514

35) KRÄMER, D.M., LEHMANN, K., PLAINER, H., REISNER, W., SPRÖSSLER, B.G.
(1974) J. Polymer. Sci. Symposium 47, 77 - 87

36) BERGMEYER, H.U.
(1974) Methoden der enzymatischen Analyse, 1052 - 1059

37) WALSH, K.A., WILCOX, P.E.
(1970) Methods of Enzymology XIX, 37 - 62

38) Biochemica MERCK, Polymergebundene Enzyme

39) ERLANGER, B.F., KOKOWSKI, N., COHEN, W.
(1961) Arch. of Biochem. and Biophys. 95, 271 - 278

40) MOLE, J.E., HORTON, H.R.
(1973) Biochem. 12, No. 5, 816 - 822

41) BAINES, N.J., BAIRD, J.B., ELMORE, D.T.
(1964) Biochem. J. 90, 470 - 476

42) LEE, Y.Y., FRATZKE, A.R., WUN, K., TSAO, G.T.
(1976) Biotechnol. Bioeng. 18, 389

43) MATTIASSON, B., MOSBACH, K.
(1976) Methods of Enzymology 44, 717

44) KOCH-SCHMIDT, A.C.
(1977) Immobilized Enzymes and Proteins (CHANG, T.M.S. ed.) Vol. 1, Plenum Press New York, 47

45) KOBAYASHI, T., HIROSE, Y., OHMIYA, S., UCHINO, F.
(1978) J. Ferment. Technol. 56, 309

Mein ganz besonders aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dieter Palm, der sich außerordentlich bemüht hat, mich in die Thematik der Arbeit einzuführen und der mir durch seinen tatkräftigen Rat bei der experimentellen Durchführung und der Abfassung der Ausführungen sehr geholfen hat.

LEBENSLAUF

Am 19.5.1950 wurde ich als Sohn des technischen Kaufmanns Hans Bade und seiner Ehefrau Ursula, geb. Brühschwein in Hof/Saale geboren.

Vom September 1956 bis Juli 1960 besuchte ich die Martin-Luther-Volksschule und vom September 1960 bis Juni 1970 das Christoph-Scheiner-Gymnasium in Ingolstadt, wo ich am 20.6.1970 das Abitur mit Erfolg ablegte.

Vom Juli 1970 bis Dezember 1971 leistete ich meinen Wehrdienst ab.

Ab Wintersemester 1971/72 bis zum Wintersemester 1972/73 studierte ich an der Universität Tübingen Chemie. Nach der Zulassung begann ich im Sommersemester 1973 an der Universität Erlangen das Medizinstudium. Im Wintersemester 1973/74 wechselte ich an die Universität Würzburg, wo ich am 3.4.1974 die naturwissenschaftliche und am 23.4.1975 die ärztliche Vorprüfung mit Erfolg ablegte. Am 18.5.1979 beendete ich mein Studium mit dem bestandenem 3. Staatsexamen.

Druckerei A. Staudenraus Würzburg